

* NOTICES *

2002-65832

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Support for filter-like biological specific reaction measurement characterized by consisting of an organic polymer of the shape of a filter which has 1-100-micrometer pore size.

[Claim 2] An organic polymer A polyamide, polyamidoimide, polyarylate, polyimide, Polyether imide, a polyether ether ketone, polyethylene, Polyethylene oxide, polyester, a polycarbonate, polystyrene, The poly ape phone, polyether sulphone, PORIPA lame chill styrenie, the poly allylamine, Polyvinyl alcohol, polyvinyl ether, a polyvinyl butyral, A polyvinyl formal, polyphenylene ether, polyphenylene sulfide, Polybutylene terephthalate, polypropylene, the poly methyl pentene, Acrylic resin, methacrylic resin, an epoxy resin, xylene resin, guanamine resin, Diallyl phthalate resin, vinyl ester resin, phenol resin, an unsaturated polyester resin, Support for filter-like biological specific reaction measurement according to claim 1 which is at least one sort or two sorts or more of mixture chosen from the group which consists of furan resin, polyimide, Polly para hydroxybenzoic acid, polyurethane, maleic resin, melamine resin, and urea resin resin.

[Claim 3] Support for according to claim 1 or 2 filter [with which hydrolysis on the front face of fiber, corona discharge, plasma treatment, UV-ozonization, and at least one sort of surface treatment as which it was chosen out of the group which it becomes from spreading of an active substance were made]-like biological [an organic filter-like polymer] specific reaction measurement.

[Claim 4] The quality of a device under test and the first matter which reacts specifically in the lower part of the support for filter-like biological specific reaction measurement according to claim 1 to 3 The biological specific reaction measuring instrument which prepared the absorption layer which absorbs the liquid which passed this support for filter-like biological specific reaction measurement is used. From the porous filter upper part of this instrument, sequential supply of the sample containing the quality of a device under test, and the quality of a device under test which combined the detectable signal generating matter and the second matter which reacts specifically is carried out. The measuring method characterized by computing the amount of the quality of a device under test in a sample by measuring the signal originating in this signal generating matter.

[Claim 5] The measuring method according to claim 4 whose quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgG.

[Claim 6] The biological specific reaction measuring instrument which prepared the absorption layer which absorbs the liquid which passed this support for filter-like biological specific reaction measurement is used for the lower part of the support for filter-like biological specific reaction measurement according to claim 1 to 3 which fixed the fourth matter which reacts to the third matter specifically. The mixed liquor which made the quality of a device under test add and react to the combination of the quality of a device under test, the first matter which reacts specifically, and the third matter from the porous filter upper part, And the measuring method which carries out sequential supply of the quality of a device under test which combined the detectable signal generating matter, and the second matter which reacts specifically, and is characterized by computing the amount of the quality of a device under test in a sample by measuring the signal originating in this signal generating matter.

[Claim 7] The measuring method according to claim 6 which the third matter is a biotin and is one sort chosen from the group which the fourth matter becomes from avidin, streptoavidin, and an antibiotin antibody.

[Claim 8] The measuring method according to claim 6 or 7 whose quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgG.

[Claim 9] The measuring method according to claim 6 or 7 whose quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgE.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the support for filter-like biological specific reaction measurement used in the measuring method and this measuring method of the matter which participate in a specific reaction based on biological specific reactions, such as antigen antibody reaction, DNA-DNA, DNA-RNA, and RAN-RNA hybridization.

[0002]

[Description of the Prior Art] As an approach of fixing reactant in porous matrices, such as film and a filter, specifically with the quality of a device under test, and analyzing the quality of a device under test using this, it is Methods in Enzymology, for example. ; The measuring method of IgE is reported in the 73rd volume and the 646-656th page (1981). Moreover, in the ***** No. 500384 [60 to] official report, it is reported that the filter which consists of glass, a metal, polysaccharide, etc. can be used as a porous matrix.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In the cellulose currently used widely as a porous matrix in immuno chromatography etc., and its derivative membrane, structure is precise, it is hard to pass the liquid containing a high viscous liquid or a particle, and there is a problem that the blood serum applied especially as a specimen brings about the analysis result which started blinding and was mistaken. In order to avoid this, a blood serum is diluted, before applying a blood serum etc., viscosity is lowered, or pre-filter filtration and centrifugal separation actuation are performed, and a problem has the actuation except a particle etc. in respect of operability, such as need, and simple nature.

[0004] In order to mitigate pretreatment actuation of such a sample, the example which uses the glass fiber filter which was excellent in the coarse dipping nature of an eye compared with the membrane as a porous matrix also appears here and there. However, since glass has negative charge, it is easy to combine the matter in a sample by ionic bond etc. nonspecific, and the case where the analysis result which this matter combined nonspecific mistook is brought about can often see it.

[0005] This invention avoids pretreatment of a sample and offers the support for filter-like biological specific reaction measurement which can obtain a right inspection result. Furthermore, this invention offers the measuring method which used this support for biological specific reaction measurement.

[0006]

[Means for Solving the Problem] In the analytical method which makes reactant solid phase specifically with the quality of a device under test as a result of this invention person's inquiring wholeheartedly in view of the above-mentioned situation Pretreatment of a complicated sample is unnecessary, without spoiling the physical properties of a filter by the swelling of fiber etc., even when it dips in liquid by using the porous filter which consists of an organic polymer of a specific class and has specific pore size. And the non-specific reaction by the matter in a sample is controlled, and it came to complete a header and this invention for a right analysis result being obtained.

[0007] That is, this invention has the following configurations.

(1) Support for filter-like biological specific reaction measurement characterized by consisting of an organic polymer of the shape of a filter which has 1-100-micrometer pore size.

An organic polymer (2) A polyamide, polyamidoimide, polyarylate, Polyimide, polyether imide, a polyether ether ketone, polyethylene, Polyethylene oxide, polyester, a polycarbonate, polystyrene, The poly ape phone, polyether sulphone, PORIPA lame chill styrene, the poly allylamine, Polyvinyl alcohol, polyvinyl ether, a polyvinyl butyral, A polyvinyl formal, polyphenylene ether, polyphenylene sulfide, Polybutylene terephthalate, polypropylene, the poly methyl pentene, Acrylic resin, methacrylic resin, an epoxy resin, xylene resin, guanamine resin, Diallyl phthalate resin, vinyl ester resin, phenol resin, an unsaturated polyester resin, furan resin — polyimide — Polly — para hydroxybenzoic acid — polyurethane — maleic resin — melamine resin — and — a urea resin — resin — becoming — a group — from — choosing — having had — at least — one — a sort — or — two — a sort — more than — mixture — it is — (— one —) — a publication — a filter — ** — biological — a specific reaction — measurement — ** — support .

(3) Support for given in (1) by which hydrolysis [on the front face of fiber], corona discharge, plasma treatment, UV-ozonization, and at least one sort of surface treatment as which it was chosen out of group which it becomes from spreading of active substance were made, or (2) filter-like biological [an organic filter-like polymer] specific reaction measurement.

(4) In the lower part of the support for filter-like biological specific reaction measurement given in either of (1) - (3), the quality of a device under test and the first matter which reacts specifically The biological specific reaction measuring instrument which prepared the absorption layer which absorbs the liquid which passed this support for filter-like biological specific reaction measurement is used. From the porous filter upper part of this instrument, sequential supply of the sample containing the quality of a device under test, and the quality of a device under test which combined the detectable signal generating matter and the second matter which reacts specifically is carried out. The measuring method characterized by computing the amount of the quality of a device under test in a sample by measuring the signal originating in this signal generating matter.

(5) The measuring method given in (4) the given quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgG.

(6) The fourth matter which reacts to the third matter specifically (1) fixed The biological specific reaction measuring instrument which prepared the absorption layer which absorbs the liquid which passed this support for filter-like biological specific reaction measurement is used for the lower part of the support for filter-like biological specific reaction measurement given in either of - (3). The mixed liquor which made the quality of a device under test add and react to the combination of the quality of a device under test, the first matter which reacts specifically, and the third matter from the porous filter upper part, And the measuring method which carries out sequential supply of the quality of a device under test which combined the detectable signal generating matter, and the second matter which reacts specifically, and is characterized by computing the amount of the quality of a device under test in a sample by measuring the signal originating in this signal generating matter.

(7) The measuring method given in (6) which the third matter is a biotin and is one sort chosen from the group which the fourth matter becomes from avidin and a streptoavidin **** antibiotin antibody.

(8) A measuring method given in (6) whose quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgG, or (7).

(9) A measuring method given in (6) whose quality of a device under test is antigen specific Homo sapiens IgE, or (7).

[0008]

[Embodiment of the Invention] In this invention, it has the description that the organic polymer used as support has little swelling by water absorption. Specifically For example, a polyamide, polyamidoimide, polyarylate, Polyimide, polyether imide, a polyether ether ketone, polyethylene, Polyethylene oxide, polyester, a polycarbonate, polystyrene, The poly ape phone, polyether

sulphone, PORIPA lamer, styrene, the poly allylamine, Polyvinyl alcohol, polyvinyl ether, a polyvinyl butyral, A polyvinyl formal, polyphenylene ether, polyphenylene sulfide, Polybutylene terephthalate, polypropylene, the poly methyl pentene, Acrylic resin, thermoplastics like methacrylic resin, an epoxy resin, Xylene resin, guanamine resin, diallyl phthalate resin, vinyl ester resin, Phenol resin, an unsaturated polyester resin, furan resin, polyimide, Poly para hydroxybenzoic acid, polyurethane, maleic resin, melamine resin, urea resin resin, etc. are mentioned. A polyamide, polystyrene, and especially polypropylene are [among these] desirable. These may be used by the one-sort independent and may be used as two or more sorts of mixture.

[0009] As a configuration of the porous filter in this invention, although the so-called surface filter, a depth filter, etc. are common, in order to maintain the outstanding dipping nature, a depth filter is desirable. The pore size of this porous filter has desirable 1-100 micrometers, and its 1-10 micrometers are more desirable.

[0010] Since association to biological matter, such as the above-mentioned porous filter, an antibody and an antigen, DNA and RNA, and sugar, is strengthened, it is possible for you to also make it reform by performing suitable surface treatment.

[0011] Although not limited especially as an approach in the case of performing the above-mentioned surface treatment, the approach of applying active substances, such as installation of the functional group by the restrictive hydrolysis on resin or the front face of fiber, corona discharge, plasma treatment, UV-ozonization, and a carbodiimide (poly carbodiimide), to a front face etc. is mentioned as a general approach.

[0012] Although the absorption layer used in this invention is not limited especially if a water liquid is absorbed and can be held, it is desirable that it is the laminated material which consists of a point to the cellulose or cellulosic fiber of rate of absorption of an aqueous liquid.

[0013] Although it is not necessarily required in this invention, as for an antisuckback layer, preparing is desirable when communication of the liquid between a porous filter and an absorption layer needs to be cut off. As this antisuckback layer, what has high hydrophobicity, such as a nonwoven fabric sheet made from polyolefine and a wave, and voidage is suitable, for example.

[0014] The measuring method of this invention is based on a biological specific reaction. As an example of a biological specific reaction, the hybridization of (1) antigen antibody reaction, (2) DNA-DNA, RNA-DNA, and RNA-RNA, a (3) sugar-lectin reaction, a (4) ligand-receptor reaction, a (5) avidin-biotin reaction, etc. are mentioned. One of these serves as the first matter or the second matter, and another side serves as quality of a device under test. It is not only independently usable, but these can combine some reactions.

[0015] When combining the biological unique matter with a porous filter, after having been fabricated by the porous filter, even if it joins together, after joining together, you may fabricate in a filter. Although noncovalent bonds, such as a hydrophobic bond and ionic bond, are also possible as the approach of association, it is desirable to carry out covalent bond in the semantics which prevents the desorption from the support of this matter. As the approach of covalent bond, the glutaraldehyde method and the carbodiimide method which use a carboxyl group, the amino group, and a sulfhydryl group, and the maleimide method are common.

[0016] As matter which generates the detectable signal used in this invention For example, a peroxidase, beta-D-galactosidase, alkaline phosphatase, A malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose oxidase, enzymes, such as an invertase, and I125 etc. — radioisotope and a fluorescein isothiocyanate — A tetramethyl rhodamine, tetramethyl DAMIN isothiocyanate, Dimethylamino naphthalene-5-sulfonium chloride, full ORAMU, The matter of coloring particles, such as photogene, such as fluorescent materials, such as an europium chelate, acridinium ester, and an acridinium sulfonamide, gold colloid, selenium colloid, and a coloring latex, and others is mentioned.

[0017] What is necessary is just to measure the reflective absorbance of a resultant, fluorescence intensity, luminescence reinforcement, etc., after making an enzyme react with a substrate when the signal generating matter is an enzyme, for example although what is necessary is just to perform the approach of measuring the signal generating matter according to

a well-known approach. What is necessary is just to measure a dose, when the signal generating matter is radioisotope. What is necessary is just to measure direct fluorescence intensity, when the signal generating matter is a fluorescent material. What is necessary is just to measure direct luminescence reinforcement, when the signal generating matter is photogene.

[0018] Although especially the penetrant remover used in this invention is not limited, a buffer-ized physiological saline, distilled water, etc. are usually used. It is also possible to add a surfactant etc. as occasion demands.

[0019] In this invention, as the matter of a device under test set as the object of measurement, i.e., quality Although not limited especially, a hepatitis A virus, a hepatitis B virus, A hepatitis C virus (it is hereafter indicated as HCV), D mold hepatitis virus, E mold hepatitis virus, A female mold hepatitis virus, G mold hepatitis virus, HIV, HTLV-I, a Herpes virus, The rotavirus, a toxoplasma, RUBERA, chlamydia, spirohete, Infectious disease relation markers, such as Helicobacter Pylori and treponeme PARIDAMU, Tumor markers, such as CEA, CA 19-9, CA125 and AFP, ferritin, DUPAN-II, and facilities occult blood, other CRP, ASO and RF, APORIPOPUROTEIN, beta2-microglobulin, total IgE, unique IgE, etc. are mentioned.

[0020] Hereafter, a concrete example is given and this invention is explained to a detail.

[0021] Example 1 The measurement (preparation of reactor implement) pore size of a HCV antibody was slowly immersed in distilled water, and soaked 1 and the nylon filter which is 5 or 10 micrometers in homogeneity. Then, it inserted into dot blot equipment (Bio-Rad biotechnology dot), and the inside of dot blot equipment was made weak reduced pressure with the PERISUTA rucksack pump. From the inlet of dot blot equipment, sequential supply of the liquid to which 100micro of buffer-ized physiological salines L containing buffer-ized physiological saline (pH7.2) 100microL, HCV antigen peptide solution 100microL, buffer-ized physiological saline (pH7.2) 100microL, and an antigen stabilizing agent was supplied immediately before being attracted was waited for and carried out. Then, after removing the nylon filter from dot blot equipment and removing excessive moisture on a filter paper, it dried at the room temperature, it sealed with the drying agent till use, and saved in the cool place. At the time of use, the part which combined the antigen of a nylon filter was separated and it set to the opening side of the container which has opening, behind the laminating, the absorption layer which consists of a cellulose further was fixed by the bottom plate so that laminated material might not fall, and it considered as the reactor implement.

[0022] (Preparation of a labelled antibody) The anti-Homo sapiens IgG monoclonal antibody (Cappel make) and the horseradish origin peroxidase (Toyobo make) were combined according to the approach of NAKANE, the column refined an anti-Homo sapiens IgG monoclonal antibody and the combination of a horseradish origin peroxidase, and it saved in the cool place till use.

[0023] (Analytic implementation) 50micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L was supplied from opening of the reactor implement prepared as mentioned above, and the filter was made into the moisture state. Then, sequential supply of the solution which supplied 20micro of solutions L which have not pretreated, and which diluted specimen 50microL containing an anti-HCV antibody, buffer-ized physiological saline (pH7.2) 50microL which contains Tween20 0.05%, and the prepared labelled antibody immediately before being absorbed completely was waited for and carried out. It waited and supplied, and the labelled antibody of the surplus which remained in the filter was washed, and it removed that the solution which supplied twice 100micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L which contain Tween20 0.05 more% just before was absorbed completely. 3, 3', and 5 and 50micro of 5'-tetramethyl benzidine solutions L were supplied as a substrate of a horseradish origin peroxidase, and the reflective absorbance of 670nm was read after the reaction for 1 minute.

[0024] Although the nylon filter with small pore size was good in respect of sensibility, measurement of the anti-HCV antibody which has not pretreated in the nylon filter which has which pore size was possible. A result is shown in Table 1.

[0025]

[Table 1]

HCV抗体分析結果(反射吸光度)
ナイロンフィルター

	細孔径 (μm)				
	0.20	0.45	1.00	5.00	10.00
検体1	-	-	0.003	0.003	0.002
検体2	-	-	0.989	0.886	0.713
検体3	-	-	0.847	0.811	0.711
検体4	-	-	0.112	0.079	0.074
検体5	-	-	0.004	0.001	0.002
検体6	-	-	0.003	0.002	0.002
検体7	-	-	0.162	0.156	0.134
検体8	-	-	0.003	0.002	0.003
検体9	-	-	1.002	0.974	0.837
検体10	-	-	0.012	0.005	0.007

-: 分析不可能

[0026] Example of comparison 1 pore size used the nylon filter which are 0.2 micrometers and 0.45 micrometers, and performed preparation of a reactor implement, preparation of a labelled antibody, and analysis like the example 1. With the nylon filter which has pore size these 1 micrometers or less, when the specimen containing an anti-HCV antibody was applied, the filter started blinding, application of subsequent reagents was not completed, and analysis was not able to carry out to the last.

[0027] In order to analyze without starting blinding from the comparison of an example 1 and the example 1 of a comparison even if it applies the blood serum which has not been pretreated through a pre-filter etc., it is shown that the porous filter which has pore size 1 micrometers or more is the need.

[0028] Example 2 The measurement (preparation of reactor implement) nylon fiber of an anti-treponemal antibody, a polyethylene fiber, polyester fiber, the polypropylene fiber, and the polystyrene fiber were cut to an even length in die length of 3mm, and it was immersed in the methanol solution of the poly carbodiimide. It reacted stirring at 40 degrees C for 3 hours, and the poly carbodiimide layer was formed in the fiber front face. It dried, after the methanol washed. Subsequently, the fiber which carried out surface treatment to the treponeme PARIDAMU extract purification object solution was added, it reacted at the room temperature for 3 hours, and the treponeme PARIDAMU extract purification object was combined with fiber. [0029] After the buffer-ized physiological saline (pH7.2) washed the fiber after association 3 times, it suspended in the buffer-ized physiological saline (pH7.2) containing a stabilizing agent. The suspension of fiber was moved on the glass filter and the filter which the treponeme PARIDAMU extract purification object combined by drawing in slowly was prepared. Each pore size at this time was about 3-30 micrometers. This filter was sealed with the drying agent till use, and was saved in the cool place. the time of use — a filter — it cut in suitable magnitude and set to the opening side of the container which has opening, behind the laminating, the absorption layer which consists of a cellulose further was fixed by the bottom plate so that laminated material might not fall, and it considered as the reactor implement.

[0030] (Preparation of a labelled antibody) The beef round casing origin alkaline phosphatase (product made from BERINGA) which introduced the anti-Homo sapiens IgG monoclonal antibody which decomposed by the pig stomach origin pepsin and was made into Fab', and the maleimide radical was mixed, and the reaction was performed at 4 degrees C for 20 hours. Purification concentration of the alkaline phosphatase-Fab' complex was carried out with the column, and it saved in the cool place till use.

[0031] (Analytic implementation) 50micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L was supplied from opening of the reactor implement prepared as mentioned above, and the filter was made into the moisture state. Then, sequential supply of the solution which supplied 20micro of solutions L which diluted specimen 50microL containing an anti-treponeme PARIDAMU antibody, buffer-ized physiological saline (pH7.2) 50microL which contains Tween20 0.05%, and the prepared labelled antibody immediately before being absorbed completely was waited for and

carried out. It waited and supplied, and the labelled antibody of the surplus which remained in the filter was washed, and it removed that the solution which supplied twice 100micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L which contain Tween20 0.05 more% just before was absorbed completely. 50micro of 4-methyl umbelliferryl phosphoric-acid solutions L was supplied as a substrate of alkaline phosphatase, light with an excitation wavelength of 360nm was irradiated after the reaction for 1 minute on the filter top face, and fluorometry was carried out by 450nm. Quantum measurement of a treponeme PARIDAMU antibody was possible, without any filter starting blinding. A result is shown in Table 2.

[0032]

[Table 2]

各素材のトレホネーマ・パリダム分析結果(蛍光強度 cpm)

	ナイロン	ポリエチレン	ポリエステル	ポリプロピレン	ポリスチレン	ガラス
検体1	228	83	251	116	103	42800
検体2	213	88	197	92	112	40200
検体3	43600	38900	41900	37700	40100	43100
検体4	117	65	184	83	98	39400
検体5	3240	2970	3680	2210	2880	41700

[0033] Example of comparison 2 (preparation of a reactor implement) pore size carried out the dipping of the glass fiber filter which is 3 micrometers to distilled water slowly, and soaked it in homogeneity. Then, it inserted into commercial dot blot equipment, and the inside of dot blot equipment was made weak reduced pressure with the PERISUTA rucksack pump. From the inlet of dot blot equipment, sequential supply of the liquid to which 100micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L containing buffer-ized physiological saline (pH7.2) 100microL, treponeme PARIDAMU extract purification object solution 100microL, buffer-ized physiological saline (pH7.2) 100microL, and a stabilizing agent was supplied immediately before being attracted was waited for and carried out. Then, after removing the glass fiber filter from dot blot equipment and removing excessive moisture on a filter paper, it dried under reduced pressure, it sealed with the drying agent till use, and saved in the cool place. At the time of use, the part which combined the treponeme PARIDAMU extract purification object was separated, and it set to the opening side of the container which has opening, behind the laminating, the absorption layer which consists of a cellulose further was fixed by the bottom plate so that laminated material might not fall, and it considered as the reactor implement.

[0034] (Analytic implementation) Preparation of a labelled antibody and analysis were performed like the example 2. although there is no plugging of a specimen and it has analyzed to the last like [a glass fiber filter] the filter of an example 2 — Homo sapiens IgG — nonspecific — a glass fiber filter — remaining — treponeme PARIDAMU — measurement of specific IgG was difficult.

[0035] Although antibody measurement could not be carried out from the comparison of an example 2 and the example 2 of a comparison since Homo sapiens IgG remained nonspecific when a glass fiber filter was used as support, Homo sapiens IgG stopped being able to remain in a filter easily due to making a filter material into nylon, polyethylene, polyester, polypropylene, and polystyrene, and the useful thing was shown in antibody measurement. A result is collectively shown in Table 2.

[0036] Example 3 Corona discharge treatment of the filter which the measurement (preparation of reactor implement) polystyrene fiber and polypropylene fiber of specific IgE mixed was carried out. An antibiotin polyclonal antibody is diluted with the carbonic acid buffer solution (pH9.6) of 0.1M, and the above-mentioned filter is immersed in the solution made into the concentration of 10microg/mL, and you incubated for 3 hours and made it physisorb at 40 degrees. The buffer-ized physiological saline (pH7.2) which contains Tween20 0.05% fully washed after incubation, and reduced pressure drying was carried out after being immersed in the buffer-ized physiological saline (pH7.2) which finally contains a stabilizing agent. The above-mentioned filter was sealed with the drying agent till use, and was saved in the cool place. At the time of use, the above-mentioned filter was cut in suitable magnitude, and it set to the opening side of the container

which has opening, behind the laminating, the absorption layer which consists of a cellulose further was fixed by the bottom plate so that laminated material might not fall, and it considered as the reactor implement.

[0037] (Preparation of a labelled antibody) The anti-Homo sapiens IgE monoclonal antibody (Cappel make) and the horseradish origin peroxidase were made to combine like an example 1, the column refined an anti-Homo sapiens IgE monoclonal antibody and the combination of a horseradish origin peroxidase, and it saved in the cool place till use.

[0038] (Preparation of biotin-house dust combination) A commercial biotin-ized reagent (Nakarai Tesuku make) and house dust were mixed, and it incubated at the room temperature for 3 hours. after that Sephadex G-25 It refined and came out in the column (Pharmacia Biotech make), and biotin-house dust combination was prepared.

[0039] (Analytic implementation) 50micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L was supplied from opening of the reactor implement prepared as mentioned above, and the filter was made into the moisture state. Then, sequential supply of the liquid which mixed 50micro of an allergic subject's specimens L and 50micro of biotin-allergen combination L, and was left for 10 minutes, and the solution which supplied 20micro of solutions L which diluted the prepared labelled antibody immediately before being absorbed completely was waited for and carried out. It waited and supplied, and the labelled antibody of the surplus which remained in the filter was washed, and it removed that the solution which supplied twice 100micro (pH7.2) of buffer-ized physiological salines L which contain Tween20 0.05 more% just before was absorbed completely. 3, 3', and 5 and 50micro of 5'-tetramethyl benzidine solutions L were supplied as a substrate of a horseradish origin peroxidase, and the reflective absorbance of 670nm was read after the reaction for 1 minute.

[0040] The above-mentioned measurement result is shown in drawing 1 . The value with a high reflective absorbance was acquired in the house dust allergic subject. On the other hand, there was no example from which Homo sapiens IgE remains in a filter nonspecific by the electronegative specimen.

[0041]

[Effect of the Invention] As mentioned above, it is realized that the measuring method using the support for filter-like biological specific reaction measurement and it in this invention obtains the high analysis result of precision removed in the effect by the non-specific reaction by simple actuation.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the result of having analyzed an allergic subject's specimen by the approach of this invention.

[Translation done.]

* NOTICES *

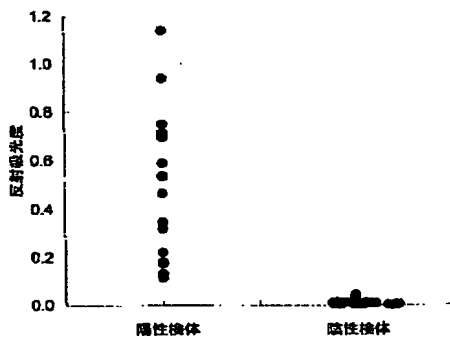
JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 1]

アレルギー患者検体分析結果



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-65832
(P2000-65832A)

(43) 公開日 平成12年3月3日 (2000.3.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/537		G 0 1 N 33/537	4 B 0 3 3
C 1 2 N 11/08		C 1 2 N 11/08	Z
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	N
			U
33/543	5 9 1	33/543	5 9 1
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-234075

(22) 出願日 平成10年8月20日 (1998.8.20)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 種部 勝

大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号

東洋紡績株式会社本社内

(72) 発明者 羽生 恒男

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

Fターム (参考) 4B033 NA01 NA43 NB03 NB12 NB34

NB37 NB65 NC12 ND06 ND08

(54) 【発明の名称】 フィルター状生物学的特異反応測定用担体およびそれを用いた測定方法

(57) 【要約】

【課題】 試料の前処理を回避し、正しい検査結果を得ることができるフィルター状生物学的特異反応測定用担体、並びに該生物学的特異反応測定用担体を用いた測定方法を提供する。

【解決手段】 1～100 μ mの細孔径を有するフィルター状の有機ポリマーからなることを特徴とするフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1～100 μm の細孔径を有するフィルター状の有機ポリマーからなることを特徴とするフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

【請求項 2】 有機ポリマーがポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアリレート、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレン、ポリエチレンオキサイド、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラル、ポリビニルホルマール、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、アクリル樹脂、メタクリル樹脂、エポキシ樹脂、キシレン樹脂、グアナミン樹脂、ジアリルフタレート樹脂、ビニルエステル樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、フラン樹脂、ポリイミド、ポリ p -ヒドロキシ安息香酸、ポリウレタン、マレイン酸樹脂、メラミン樹脂およびユリア樹脂樹脂よりなる群から選ばれた少なくとも 1 種もしくは 2 種以上の混合物である請求項 1 記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

【請求項 3】 フィルター状の有機ポリマーが、繊維表面の加水分解、コロナ放電、プラズマ処理、UV-オゾン処理、活性物質の塗布よりなる群から選ばれた少なくとも 1 種の表面処理がなされた請求項 1 または 2 に記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

【請求項 4】 被測定物質と特異的に反応する第一の物質が請求項 1～3 のいずれかに記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体の下部に、該フィルター状生物学的特異反応測定用担体を通過した液体を吸収する吸収層を設けた生物学的特異反応測定器具を使用し、該器具の多孔性フィルター上部から、被測定物質を含む試料、及び検出可能なシグナル発生物質を結合した被測定物質と特異的に反応する第二の物質を順次供給し、該シグナル発生物質に由来するシグナルを測定することにより試料中の被測定物質の量を算出することを特徴とする測定方法。

【請求項 5】 被測定物質が抗原特異的ヒト IgG である請求項 4 記載の測定方法。

【請求項 6】 第三の物質に特異的に反応する第四の物質を固定化した請求項 1～3 のいずれかに記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体の下部に該フィルター状生物学的特異反応測定用担体を通過した液体を吸収する吸収層を設けた生物学的特異反応測定器具を使用し、多孔性フィルター上部から、被測定物質と特異的に反応する第一の物質と第三の物質の結合物体に被測定物質を加えて反応させた混合液、及び検出可能なシグナル発生物質を結合した被測定物質と特異的に反応する第二の物質を順次供給し、該シグナル発生物質に由来するシグ

ナルを測定することにより試料中の被測定物質の量を算出することを特徴とする測定方法。

【請求項 7】 第三の物質がビオチンであり、かつ第四の物質がアビジン、ストレプトアビジンおよび抗ビオチン抗体よりなる群から選ばれた 1 種である請求項 6 記載の測定方法。

【請求項 8】 被測定物質が抗原特異的ヒト IgG である請求項 6 または 7 に記載の測定方法。

【請求項 9】 被測定物質が抗原特異的ヒト IgE である請求項 6 または 7 に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原-抗体反応、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA ハイブリダイゼーション等の生物学的特異反応に基づき、特異反応に関与する物質の測定方法および該測定方法において用いられるフィルター状生物学的特異反応測定用担体に関する。

【0002】

【従来の技術】被測定物質と特異的に反応する物質を、例えば、膜、フィルターなどの多孔性マトリックスに固定化して、これを利用して被測定物質を分析する方法としては、例えば、Methods in Enzymology ; 第 73 巻、第 646～656 頁 (1981 年) において、IgE の測定方法が報告されている。また、特表昭 60-500384 号公報においては、多孔性マトリックスとして、ガラス、金属、多糖類等からなるフィルターを使用し得ることが報告されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】イムノクロマト等において多孔性マトリックスとして汎用されているセルロースおよびその誘導体メンブランでは構造が緻密で、高粘性液体や粒子を含む液体が通過しにくく、特に検体として適用された血清が目詰まりを起こして、誤った分析結果をもたらすといった問題がある。これを避けるため、血清等を適用する前に血清を希釈して粘度を下げたり、プレフィルター濾過や遠心分離操作を行い、粒子等を除く操作が必要など操作性、簡便性の点で問題がある。

【0004】この様な試料の前処理操作を軽減するた

め、メンブランに比べて目の粗い通液性に優れたガラス繊維フィルターを多孔性マトリックスとして使用する例も散見される。しかしながら、ガラスは負の電荷を持つため、試料中の物質がイオン結合等によって非特異的に結合しやすく、この非特異的に結合した物質が誤った分析結果をもたらす場合がしばしば見受けられる。

【0005】本発明は、試料の前処理を回避し、正しい検査結果を得ることができるフィルター状生物学的特異反応測定用担体を提供するものである。さらに本発明は、該生物学的特異反応測定用担体を使用した測定方法を提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、被測定物質と特異的に反応する物質を固相とする分析方法において、特定の種類の有機ポリマーからなり特定の細孔径を有する多孔性フィルターを使用することによって、液に浸した場合でも繊維の膨潤などによりフィルターの物性を損なうことなく、煩雑な試料の前処理が不要で、かつ試料中の物質による非特異反応を抑制し、正しい分析結果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち、本発明は以下のような構成を有する。

(1) 1～100 μ mの細孔径を有するフィルター状の有機ポリマーからなることを特徴とするフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

(2) 有機ポリマーがポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアリレート、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレン、ポリエチレンオキシaid、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、アクリル樹脂、メタクリル樹脂、エポキシ樹脂、キシレン樹脂、グアナミン樹脂、ジアリルフタレート樹脂、ビニルエステル樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、フラン樹脂、ポリイミド、ポリ-p-ヒドロキシ安息香酸、ポリウレタン、マレイン酸樹脂、メラミン樹脂およびユリア樹脂樹脂よりなる群から選ばれた少なくとも1種もしくは2種以上の混合物である(1)記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

(3) フィルター状の有機ポリマーが、繊維表面の加水分解、コロナ放電、プラズマ処理、UV-オゾン処理、活性物質の塗布よりなる群から選ばれた少なくとも1種の表面処理がなされた(1)または(2)に記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体。

(4) 被測定物質と特異的に反応する第一の物質が

(1)～(3)のいずれかに記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体の下部に、該フィルター状生物学的特異反応測定用担体を通過した液体を吸収する吸収層を設けた生物学的特異反応測定器具を使用し、該器具の多孔性フィルター上部から、被測定物質を含む試料、及び検出可能なシグナル発生物質を結合した被測定物質と特異的に反応する第二の物質を順次供給し、該シグナル発生物質に由来するシグナルを測定することにより試料中の被測定物質の量を算出することを特徴とする測定方法。

(5) 被測定物質が抗原特異的ヒトIgGである(4)

記載の測定方法。

(6) 第三の物質に特異的に反応する第四の物質を固定化した(1)～(3)のいずれかに記載のフィルター状生物学的特異反応測定用担体の下部に該フィルター状生物学的特異反応測定用担体を通過した液体を吸収する吸収層を設けた生物学的特異反応測定器具を使用し、多孔性フィルター上部から、被測定物質と特異的に反応する第一の物質と第三の物質の結合体に被測定物質を加えて反応させた混合液、及び検出可能なシグナル発生物質を結合した被測定物質と特異的に反応する第二の物質を順次供給し、該シグナル発生物質に由来するシグナルを測定することにより試料中の被測定物質の量を算出することを特徴とする測定方法。

(7) 第三の物質がビオチンであり、かつ第四の物質がアビジン、ストレプトアビジンおよび抗ビオチン抗体よりなる群から選ばれた1種である(6)記載の測定方法。

(8) 被測定物質が抗原特異的ヒトIgGである(6)または(7)に記載の測定方法。

(9) 被測定物質が抗原特異的ヒトIgEである(6)または(7)に記載の測定方法。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明において、担体として使用される有機ポリマーは、吸水による膨潤が少ないという特徴を有する。具体的には例えば、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアリレート、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレン、ポリエチレンオキシaid、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、アクリル樹脂、メタクリル樹脂のような熱可塑性樹脂、エポキシ樹脂、キシレン樹脂、グアナミン樹脂、ジアリルフタレート樹脂、ビニルエステル樹脂、フェノール樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、フラン樹脂、ポリイミド、ポリ-p-ヒドロキシ安息香酸、ポリウレタン、マレイン酸樹脂、メラミン樹脂、ユリア樹脂樹脂等が挙げられる。これらのうち、ポリアミド、ポリスチレン、ポリプロピレンが特に好ましい。これらは1種単独で用いてもよいし、2種以上の混合物として用いてもよい。

【0009】本発明における多孔性フィルターの形状としては、いわゆるサーフェスフィルター、デプスフィルター等が一般的であるが、優れた通液性を維持するためにはデプスフィルターが好ましい。該多孔性フィルターの細孔径は1～100 μ mが好ましく、1～10 μ mがより好ましい。

【0010】上記多孔性フィルターと、抗体、抗原、DNA、RNA、糖などの生物学的物質に対する結合を強化するため、適当な表面処理を施すことにより改質せしめることも可能である。

【0011】上記表面処理を行う場合の方法としては特に限定されるものではないが、樹脂あるいは繊維表面の限定的な加水分解による官能基の導入、コロナ放電、プラズマ処理、UV-オゾン処理、カルボジイミド（ポリカルボジイミド）などの活性物質を表面に塗布する方法などが一般的な方法として挙げられる。

【0012】本発明において用いられる吸収層は、水性の液体を吸収、収容しうるものであれば特に限定されるものではないが、水性液体の吸収速度の点から、セルロースあるいはセルロース誘導体繊維からなる積層物であることが望ましい。

【0013】逆流防止層は、本発明において必ずしも必要ではないが、多孔性フィルターと吸収層の間の液の連絡を絶つ必要がある場合には設けることが好ましい。該逆流防止層としては、例えば、ポリオレフィン製不織布シート、ウェーブなど疎水性、空隙率が高いものが適している。

【0014】本発明の測定法は、生物学的特異反応に基づくものである。生物学的特異反応の例としては、

(1) 抗原-抗体反応、(2) DNA-DNA、RNA-DNA、RNA-RNAのハイブリダイゼーション、(3) 糖-レクチン反応、(4) リガンド-レセプター反応、(5) アビジン-ビオチン反応などが挙げられる。この一方が第一の物質あるいは第二の物質となり、他方が被測定物質となる。これらは単独で使用可能ばかりではなく、いくつかの反応を組み合わせることも可能である。

【0015】多孔性フィルターに生物学的特異物質を結合する場合には、多孔性フィルターに成形された状態で結合しても、結合した後にフィルターに成形してもよい。結合の方法としては疎水結合、イオン結合などの非共有結合も可能であるが、該物質の担体からの脱離を防止する意味で共有結合せしめることが望ましい。共有結合の方法としては、カルボキシル基、アミノ基やSH基を使用するグルタルアルデヒド法、カルボジイミド法やマレイミド法が一般的である。

【0016】本発明において使用される検出可能なシグナルを発生する物質としては、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコースオキシダーゼ、インペルターゼ等の酵素、 I^{125} などのラジオアイソトープ、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ジメチルアミノナフタレン-5-スルフォニウムクロライド、フル

ジニウムエステル、アクリジニウムスルホンアミドなどの発光物質、金コロイド、セレンコロイド、着色ラテックスなどの着色微粒子、その他の物質が挙げられる。

【0017】シグナル発生物質を測定する方法は公知の方法に従って行えばよいが、例えばシグナル発生物質が酵素の場合は、酵素を基質と反応させた後、反応生成物の反射吸光度、蛍光強度、発光強度などを測定すればよい。シグナル発生物質がラジオアイソトープの場合には放射線量を測定すればよい。シグナル発生物質が蛍光物質の場合は直接蛍光強度を測定すればよい。シグナル発生物質が発光物質の場合は直接発光強度を測定すればよい。

【0018】本発明において使用される洗浄液は特に限定されるものではないが、通常は緩衝化生理食塩水、蒸留水などが使用される。必要により界面活性剤等を添加することも可能である。

【0019】本発明において、測定の対象となる物質、すなわち被測定物質としては、特に限定されるものではないが、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（以下、HCVと示す）、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、F型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、HIV、HTLV-I、ヘルペスウイルス、ロタウイルス、トキソプラズマ、ルベラ、クラミジア、スピロヘータ、ヘリコバクター・ピロリ、トレポネーマ・パリダムなどの感染症関係マーカー、CEA、CA19-9、CA125、AFP、フェリチン、DUPAN-II、便潜血などの腫瘍マーカー、その他CRP、ASO、RF、アポリポ蛋白質類、 β_2 -ミクログロブリン、総IgE、特異IgEなどが挙げられる。

【0020】以下、具体的な実施例を挙げて、本発明を詳細に説明する。

【0021】実施例1 HCV抗体の測定

(反応器具の調製) 細孔径が1、5、10 μ mのナイロンフィルターを蒸留水にゆっくりと浸漬して均一に濡らした。その後、ドットプロット装置（パイオラッド製パイオドット）に挟み、ペリスタリックポンプにてドットプロット装置内を弱減圧にした。ドットプロット装置の注入口から、緩衝化生理食塩水（pH7.2）100 μ L、HCV抗原ペプチド溶液100 μ L、緩衝化生理食塩水（pH7.2）100 μ L、抗原安定化剤を含む緩衝化生理食塩水100 μ Lを、直前に供給された液が吸引されるのを待って、順次供給した。その後、ナイロンフィルターをドットプロット装置から外し、濾紙上で余分な水分を除いた後、室温で乾燥し、使用時まで乾燥剤とともに密封して冷暗所に保存した。使用時、ナイロンフィルターの抗原を結合した部分を切り離し、開口部を有する容器の開口部側にセットし、更にセルロースからなる吸収層を積層後、積層物が落ちないように底板で固定して、反応器具とした。

【0022】（標識抗体の調製）抗ヒトIgGモノクロ

ーナル抗体（カッセル社製）と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（東洋紡績製）をナカネの方法に従い結合させ、カラムにより抗ヒトIgGモノクローナル抗体と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの結合体を精製し、使用時まで冷所に保存した。

【0023】（分析の実施）上記のように調製した反応器具の開口部から緩衝化生理食塩水（pH7.2）50μLを供給し、フィルターを含水状態とした。その後、前処理をしていない、抗HCV抗体を含む検体50μL、0.05%Tween20を含む緩衝化生理食塩水（pH7.2）50μL、調製した標識抗体を希釈した溶液20μLを、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って順次供給した。更に0.05%Tween20を含む緩衝化生理食塩水（pH7.2）100μLを2回、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って供給し、フィルターに残った余剰の標識抗体を洗浄、除去した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液50μLを供給し、1分間反応後、670nmの反射吸光度を読み取った。

【0024】感度の面では細孔径が小さいナイロンフィルターが良好であったが、いずれの細孔径を有するナイロンフィルターにおいても前処理をしていない抗HCV抗体の測定が可能であった。結果を表1に示す。

【0025】

【表1】

HCV抗体分析結果（反射吸光度）
ナイロンフィルター

	細孔径(μm)				
	0.20	0.45	1.00	5.00	10.00
検体1	-	-	0.003	0.003	0.002
検体2	-	-	0.989	0.886	0.713
検体3	-	-	0.847	0.811	0.711
検体4	-	-	0.112	0.079	0.074
検体5	-	-	0.004	0.001	0.002
検体6	-	-	0.003	0.002	0.002
検体7	-	-	0.162	0.156	0.134
検体8	-	-	0.003	0.002	0.003
検体9	-	-	1.002	0.974	0.837
検体10	-	-	0.012	0.005	0.007

-: 分析不可能

【0026】比較例1

細孔径が0.2μmおよび0.45μmのナイロンフィルターを使用し、実施例1と同様に反応器具の調製、標識抗体の調製、分析を行った。これら1μm以下の細孔径を有するナイロンフィルターでは抗HCV抗体を含む検体を適用した時点でフィルターが目詰まりを起こしてしまい、以降の試薬の適用ができず、最後まで分析が行うことができなかった。

【0027】実施例1および比較例1の比較から、プレフィルターを通すなどの前処理をしていない血清を適用しても目詰まりを起こさずに分析を行うためには、1μ

m以上の細孔径を有する多孔性フィルターが必要なことが示される。

【0028】実施例2 抗トレボネーマ抗体の測定

（反応器具の調製）ナイロン繊維、ポリエチレン繊維、ポリエステル繊維、ポリプロピレン繊維、ポリスチレン繊維を3mmの長さに切り揃え、ポリカルボジイミドのメタノール溶液に浸漬した。40℃で3時間攪拌しながら反応を行い、繊維表面にポリカルボジイミド層を形成した。メタノールで洗浄した後、乾燥した。次いで、トレボネーマ・パリダム抽出精製物溶液に表面処理した繊維を加え、室温で3時間反応して繊維にトレボネーマ・パリダム抽出精製物を結合した。

【0029】結合後の繊維を緩衝化生理食塩水（pH7.2）で3回洗浄した後、安定化剤を含む緩衝化生理食塩水（pH7.2）に懸濁した。繊維の懸濁液をグラスフィルター上に移し、ゆっくりと吸引することでトレボネーマ・パリダム抽出精製物が結合したフィルターを調製した。この時の細孔径は何れも3~30μm程度であった。このフィルターは使用時まで乾燥剤とともに密封し、冷所に保存した。使用時、フィルター適当な大きさに切断し、開口部を有する容器の開口部側にセットし、更にセルロースからなる吸収層を積層後、積層物が落ちないように底板で固定し、反応器具とした。

【0030】（標識抗体の調製）豚胃由来ペプシンで分解してFab'とした抗ヒトIgGモノクローナル抗体とマレイミド基を導入した牛小腸由来アルカリ性フォスファターゼ（ペーリンガー製）を混合し、4℃で20時間反応を行った。カラムによりアルカリ性フォスファターゼFab'複合体を精製濃縮し、使用時まで冷所に保存した。

【0031】（分析の実施）上記のように調製した反応器具の開口部から緩衝化生理食塩水（pH7.2）50μLを供給し、フィルターを含水状態とした。その後、抗トレボネーマ・パリダム抗体を含む検体50μL、0.05%Tween20を含む緩衝化生理食塩水（pH7.2）50μL、調製した標識抗体を希釈した溶液20μLを、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って順次供給した。更に0.05%Tween20を含む緩衝化生理食塩水（pH7.2）100μLを2回、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って供給し、フィルターに残った余剰の標識抗体を洗浄、除去した。アルカリ性フォスファターゼの基質として4-メチルウンベリフェリルリン酸溶液50μLを供給し、1分間反応後、フィルター上面に励起波長360nmの光を照射し、450nmで蛍光測定した。何れのフィルターも目詰まりを起こすことなく、トレボネーマ・パリダム抗体の定量測定が可能であった。結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

各素材のトレポネーマ・パリダム分析結果(蛍光強度 cpm)

	ナイロン	ポリエチレン	ポリエステル	ポリプロピレン	ポリスチレン	ガラス
検体1	228	83	251	116	103	42800
検体2	213	88	197	92	112	40200
検体3	43600	38900	41900	37700	40100	43100
検体4	117	65	184	83	98	39400
検体5	3240	2970	3680	2210	2880	41700

【0033】比較例2

(反応器具の調製) 細孔径が $3\mu\text{m}$ のガラス繊維フィルターを蒸留水にゆっくりと浸せきし均一に濡らした。その後、市販ドットプロット装置に挟み、ペリスタリックポンプにてドットプロット装置内を弱減圧にした。ドットプロット装置の注入口から、緩衝化生理食塩水(pH 7.2) $100\mu\text{L}$ 、トレポネーマ・パリダム抽出精製物溶液 $100\mu\text{L}$ 、緩衝化生理食塩水(pH 7.2) $100\mu\text{L}$ 、安定化剤を含む緩衝化生理食塩水(pH 7.2) $100\mu\text{L}$ を、直前に供給された液が吸引されるのを待って、順次供給した。その後、ガラス繊維フィルターをドットプロット装置から外し、濾紙上で余分な水分を除いた後、減圧下で乾燥し、使用時まで乾燥剤とともに密封して冷暗所に保存した。使用時、トレポネーマ・パリダム抽出精製物を結合した部分を切り離し、開口部を有する容器の開口部側にセットし、更にセルロースからなる吸収層を積層後、積層物が落ちないように底板で固定し、反応器具とした。

【0034】(分析の実施) 実施例2と同様に標識抗体の調製、分析を行った。ガラス繊維フィルターも実施例2のフィルターと同様、検体の詰まりはなく最後まで分析を実施できたが、ヒトIgGが非特異的にガラス繊維フィルターに残り、トレポネーマ・パリダム特異的なIgGの測定は困難であった。

【0035】実施例2および比較例2の比較から、ガラス繊維フィルターを担体として使用する場合、ヒトIgGが非特異的に残るため、抗体測定が実施できないが、フィルター素材をナイロン、ポリエチレン、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリスチレンとすることでヒトIgGがフィルターに残りにくくなり、抗体測定には有用であることが示された。結果を表2に併せて示す。

【0036】実施例3 特異的IgEの測定

(反応器具の調製) ポリスチレン繊維とポリプロピレン繊維の混合したフィルターをコロナ放電処理した。抗ヒトIgEポリクローナル抗体を 0.1M の炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈し、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度とした溶液に上記フィルターを浸漬し 40°C で3時間インキュベートし、物理吸着せしめた。インキュベート後、 0.05% Tween 20を含む緩衝化生理食塩水(pH 7.2)で十分に洗浄し、最後に安定化剤を含む緩衝化生理食塩水(pH 7.2)に浸漬後、減圧乾燥した。上記フィルターは使用時まで乾燥剤とともに密封し、冷所に保存した。使用時、上記フィルターを適当な大きさに切斷

し、開口部を有する容器の開口部側にセットし、更にセルロースからなる吸収層を積層後、積層物が落ちないように底板で固定し、反応器具とした。

【0037】(標識抗体の調製) 抗ヒトIgEモノクローナル抗体(カッセル社製)と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを実施例1と同様にして結合せしめ、カラムにより抗ヒトIgEモノクローナル抗体と西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの結合体を精製し使用時まで冷所に保存した。

【0038】(ビオチン-ハウスダスト結合体の調製) 市販のビオチン化試薬(ナカライテスク製)とハウスダストを混合して室温で3時間インキュベートした。その後Sephadex G-25 カラム(ファルマシア・バイオテック製)で精製し、でビオチン-ハウスダスト結合体を調製した。

【0039】(分析の実施) 上記のように調製した反応器具の開口部から緩衝化生理食塩水(pH 7.2) $50\mu\text{L}$ を供給し、フィルターを含む状態とした。その後、アレルギー患者の検体 $50\mu\text{L}$ とビオチン-アレルギー結合体 $50\mu\text{L}$ を混合して10分放置した液、調製した標識抗体を希釈した溶液 $20\mu\text{L}$ を、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って順次供給した。更に 0.05% Tween 20を含む緩衝化生理食塩水(pH 7.2) $100\mu\text{L}$ を2回、直前に供給した溶液が完全に吸収されるのを待って供給し、フィルターに残った余剰の標識抗体を洗浄、除去した。西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの基質として3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン溶液 $50\mu\text{L}$ を供給し、1分間反応後、 670nm の反射吸光度を読みとった。

【0040】上記測定結果を図1に示す。ハウスダストアレルギー患者では反射吸光度が高い値が得られた。一方、陰性検体では、ヒトIgEが非特異的にフィルターに残る例はなかった。

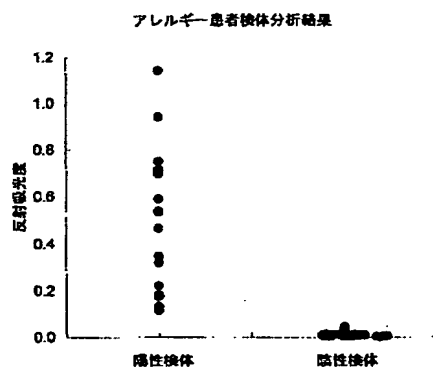
【0041】

【発明の効果】 上述したように、本発明におけるフィルター状生物学的特異反応測定用担体およびそれを用いた測定方法は、簡便な操作により、非特異反応による影響を除去された、精度の高い分析結果を得ることが実現されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法によりアレルギー患者の検体を分析した結果を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/545

識別記号

F I

G 0 1 N 33/545

テーマコード* (参考)

Z